

Campylobacter jejuni に対する Fosfomycin の試験管内 抗菌作用—新測定法による MIC の測定

後藤延一・堀内三吉・岡村 登・千田俊雄・留奥はるみ
長谷川 潔・宮崎勝昭・望月明彦・中谷林太郎
東京医科歯科大学医学部微生物学教室

(昭和 59 年 5 月 15 日受付)

下痢症患者から分離された *C. jejuni* 159 株に対する Fosfomycin(FOM) の最小発育阻止濃度 (MIC) を、5% ウマ脱線維血液と 0.2% MgCl₂ を添加した Nutrient agar(Difco) を用いる新測定法によって測定し、ABPC, EM, KM, Midecamycin acetate (MOM), NA と比較した。FOM の MIC は、MIC₉₀ が 3.13 μg/ml, MIC₅₀ が 25 μg/ml であった。これらの値は、ABPC, NA のそれらとほぼ等しく、EM, KM, MOM よりは、やや高かった。また、この新しい測定法で測った EM の MIC は、従来の方法による値と変らなかった。

近年、感染性腸炎の起因菌として、*Campylobacter jejuni* が注目を集め、各種抗菌剤に対する感受性試験の報告も数々なされている¹⁻⁴⁾。しかし、*C. jejuni* 感染症の治療に比較的良好に用いられている薬剤の内、Fosfomycin(FOM) については報告がない。その理由は、感受性試験に通常使用されている培地では、添加されている塩化ナトリウムが FOM の抗菌作用を抑制するため、FOM 感受性が低く出る⁵⁾からである。そこで FOM 感受性測定小委員会(代表:藤井良知)が組織され、測定用培地として、食塩濃度の低い Difco の Nutrient agar を使用する方法を提唱した⁶⁾が、一方 *C. jejuni* の発育は培地中の食塩濃度に依存しており⁷⁾、食塩を添加しない Nutrient agar には発育しない。そのため、これまでは *C. jejuni* に対する FOM の抗菌力を正当に評価する方法がなかったといえる。

ところが、最近、渡辺ら⁸⁾は、Nutrient agar にウマ脱線維血液を 5%、MgCl₂ を 0.2% 添加した培地を用いることによって、FOM の *C. jejuni* に対する抗菌力を測定する方法を考案した。そこで我々は、この方法を用いて、下痢症患者から分離された 159 株の *C. jejuni* の FOM 感受性を測定し、ABPC, EM, KM, Midecamycin acetate (MOM), NA 等と比較した。その結果、本方法が FOM の *C. jejuni* に対する MIC 測定法として優れていることが明らかにされたので報告する。

I. 材料と方法

菌株:東京および近郊の都市立伝染病院において、1983 年 2 月から同年 10 月までの間に、下痢症患者から分離された 159 株の *C. jejuni* を用いた。菌株は、分離

施設において 5% ウマ脱線維血液加ハートインフュージョン寒天斜面培地(栄研)に濃厚に接種、下記の方法によって培養後、直ちに当研究室宛輸送された。到着後速やかに上記血液寒天平板に塗抹培養し、かき集めた菌を 1/2 濃度の Nutrient agar (Difco) に食塩と酵母エキスを 0.5% ずつ加えた保存培地に穿刺して、37°C で保存した。

培養:培養は、BBL の Gas Pak ジャー内で、Campy Pak (BBL) と指定の触媒を用いて微好気状態とし、37°C、40~48 時間行なった。

MIC の測定:FOM 以外の薬剤の MIC 測定は、日本化学療法学会制定の標準法⁹⁾に従い、FOM の MIC は、渡辺ら⁸⁾の方法によって測定した。前培養には Heart Infusion Broth (Difco) を用い、ミクロプランター(佐久間製作所)用のミニ小試管内で微好気下で静置培養し、発育した菌をミクロプランターを用いて同じ培地で 10⁸ 倍希釈して試験用平板に接種した。試験用平板には、FOM には Nutrient agar (Difco) にウマ脱線維血液を 5%、MgCl₂ を 0.2% 添加したものを使用し、それ以外の薬剤には、感受性ディスク用培地(栄研・新処方)に 5% ウマ脱線維血液を加えたものを用いた。平板の乾燥はすべて 1 時間以内とした。また両培地を比較するため、EM については、FOM 用培地を併用した。判定は、標準法⁹⁾に従った。

試験薬剤:Fosfomycin-Na (FOM, 明治製菓, Lot No. FOMC-3, 749 μg 力価/mg), erythromycin (EM, 大日本製菓, Lot No. PD 1681, 918.2 μg 力価/mg), midecamycin acetate (MOM, 明治製菓, Lot No. CS-111, 996 μg 力価/mg), aminobenzylpenicillin (ABPC,

明治製菓, Lot No. PAMC-3, 909 μg 力価/mg), nalidixic acid (NA, 第一製菓, Lot No. D 5395, 1,000 μg 力価/mg), kanamycin sulfate (KM, 明治製菓, Lot No. KMMC-2, 680 μg 力価/mg) などの使用薬剤はすべて純末を用いた。EM と MOM はメタノールに2,000 μg 力価/ml に溶かして原液とし、以後メタノールで2倍階段希釈した。NA は最終容積の1/10量の0.05 N NaOH に溶かした後、滅菌水でうすめて1,000 μg 力価/ml の原液を作った。その他の薬剤は、いずれも滅菌精製水で溶解し、1,000 μg 力価/ml の原液を作った。

II. 結 果

C. jejuni の薬剤感受性: 159 株の *C. jejuni* に対する6種の薬剤の MIC の累積分布は Table 1 に示す通りである。FOM は 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では他のどの薬剤よりも多くの菌株を抑制したが、12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では他の薬剤よりやや劣っていた。50% の菌株を抑制する MIC (MIC_{50}) は、EM が最も低く、MOM, その他の4薬剤の順であった (Table 2)。 MIC_{90} はやはり EM が最も低く、KM, MOM がこれに次ぎ、ABPC と NA がやや高く、FOM は最も高かった (Table 2)。しかし、全体としては EM

Fig. 1 Susceptibility of 142 strains of *C. jejuni* to erythromycin as determined by using Nutrient agar supplemented with 5% horse-defibrinated blood and 0.2% MgCl_2 (●), or sensitivity disk agar supplemented with 5% horse-defibrinated blood (○)

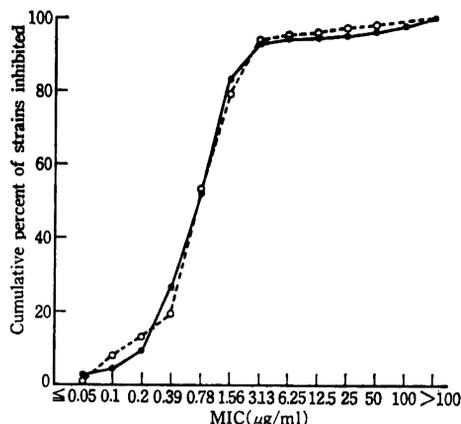


Table 1 Susceptibility of *C. jejuni* to 6 antimicrobial agents

Antimicrobial agent	No. of strains tested	Cumulative % of strains inhibited by the following antibiotic conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$):												
		≤ 0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
Fosfomycin	148	2.7	6.1	10.1	12.8	20.9	31.8	61.5	77.7	89.2	96.6	98.6	99.3	100
Ampicillin	159	3.1	4.4	5.7	10.1	23.9	37.1	64.8	89.9	96.9	99.4	100		
Erythromycin	142	2.1	4.2	9.2	26.8	51.4	83.1	93.0	94.0		95.1	95.8	97.9	100
Kanamycin	157				2.0	7.6	32.5	77.1	94.9	97.5		98.1		100
Midecamycin acetate	155	3.2	4.5	8.4	19.4	45.2	73.5	80.6	91.6	95.5	96.8	98.1	98.7	100
Nalidixic acid	158	1.0			1.3	3.8	9.5	54.5	87.3	96.2	96.8	97.5	98.1	100

Table 2 Susceptibilities of 159 clinical isolates of *C. jejuni*

Antimicrobial agent	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ^a			MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) breakpoint of resistant isolates ^b	% resistant
	Range	50%	90%		
Fosfomycin	<0.05~>100	3.13	25	—	— ^c
Ampicillin	<0.05~ 50	3.13	12.5	>16.0	3.1
Erythromycin	<0.05~>100	0.78	3.13	> 4.0	6.0
Kanamycin	0.39~>100	3.13	6.25	>32.0	1.9
Midecamycin acetate	<0.05~>100	1.56	6.25	—	—
Nalidixic acid	<0.05~>100	3.13	12.5	>16.0	3.2

^a 50% and 90%, MIC required to inhibit 50 and 90% of the isolates, respectively.

^b Breakpoints according to the performance standards for dilution antimicrobial susceptibility test (NCCLS, Vol. 3, No. 2, December, 1983).

^c Unknown.

と MOM の MIC がとりわけ低く、他の 4 薬剤の MIC は、ほぼ同じとみることができる。しかし、Table 2 に記したように EM の耐性菌に対する MIC の breaking point は $1.0 \mu\text{g/ml}$ 以上と他の薬剤よりも低いため、耐性菌の割合は却って他の薬剤よりも高かった。FOM と MOM の MIC の breaking point は求められていない。

使用培地による EM の MIC の変化：FOM の MIC 測定に用いた培地で EM の MIC を測定しても、標準法で測定した値と差がなかった (Fig. 1)。

III. 考 察

新しい測定法によって測定した、FOM の *C. jejuni* 159 株に対する MIC は、ABPC, KM, NA などのそれとほぼ等しく、EM, MOM のそれよりやや高かった。同じ方法で測定した EM の MIC が従来の測定法による値と変らなかつたことからみて、FOM の MIC 測定に用いた方法は信頼できると考えられる。因みに、同じ培地に食塩を 0.5% 添加する方法によると、これらの *C. jejuni* に対する FOM の MIC₉₀ は $100 \mu\text{g/ml}$ 以上となる (データ未発表)。また、感受性ディスク用培地を用いる方法でも同様の値が得られる。このような高い値は FOM の臨床的効果^{10,11)}と考へ合わせても、不当に高い値であり、ここで採用された新しい測定法によって得られた値が臨床上的効果を正しく反映していると考えられる。

<謝辞> 本研究は FOM 研究会、感染性腸炎研究班 (班長：斎藤 誠 荏原病院長) の共同研究において分離された菌株を使用した。ここに菌株を供与された下記の施設に感謝する。東京都立荏原病院感染症科・小児科、同豊島病院感染症科・内科・小児科、同墨東病院感染症科・小児科、同駒込病院感染症科、川崎市立川崎病院内科・小児科。また実験に協力して下さった東京理科大学理学部学生・神戸久志氏、日本女子大学家政学部学生・山崎由美子氏に感謝する。

文 献

1) KARMALI, M. A.; S. de GRANDIS, & P. C. FLEMING: Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* with special reference

to resistance patterns of Canadian isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19: 593~597, 1981

- 2) BUCK, G. E. & M. T. KELLY: Susceptibility testing of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, using broth microdilution panels. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 274~277, 1982
- 3) VANHOOF, R.; H. GOOSSENS, H. COIGNAU, G. STAS, & J. P. BUTZLER: Susceptibility pattern of *Campylobacter jejuni* from human and animal origins to different antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 990~992, 1982
- 4) 占崎悦郎, 神木照雄, 坂崎利一, 田村和清: *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni* による下痢症について。感染症誌 54: 17~21, 1980
- 5) ZIMMERMAN, S. B.; E. O. STAPLEY, H. WALLICK & R. BALDWIN: Phosphomycin. IV. Susceptibility testing method and survey. *Antimicrob. Agents Chemother.* —1969. pp. 303~309, 1970
- 6) 五島達智子, 堂ヶ崎 勲, 金子康子, 小川正俊, 滝田聖親, 桑原章吾: Fosfomycin の *in vitro*, *in vivo* 抗菌作用。Chemotherapy 23: 1633~1661, 1975
- 7) DOYLE, M. P. & D. J. ROMAN: Response of *Campylobacter jejuni* to sodium chloride. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 561~565, 1982
- 8) 渡辺忠洋, 松上敦子, 宮内慶之輔, 数野勇造, 村瀬正夫, 後藤延一, 千田俊雄, 中谷林太郎: Fosfomycin の *Campylobacter jejuni* に対する試験管内抗菌力測定法の検討。Japan. J. Antibiotics 37: 1023~1028, 1984
- 9) 五島達智子, 徐慶一郎, 河喜多竜祥, 小西井 望, 三橋 進, 西野武志, 大沢伸孝, 田波 洋: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 10) 淵上達夫, 大滝厚子, 藤田之彦, 与座明雄, 栗茂雄, 西山宜子: *Campylobacter jejuni* 腸炎に対する Fosfomycin の検討。Japan. J. Antibiotics 36: 2849~2855, 1983
- 11) 西田直己, 小西和子, 西田守治, 香坂瑞代: *Campylobacter* 腸炎に対するホスホマイシンの使用経験。小児科臨床 36: 651~654, 1983

FOSFOMYCIN SUSCEPTIBILITY OF *CAMPYLOBACTER*
JEJUNI TESTED BY A NEW METHOD

NOBUICHI GOTO, SANKICHI HORIUCHI, NOBORU OKAMURA, TOSHIO CHIDA,
HARUMI TOMEOKU, KIYOSHI HASEGAWA, KATSUAKI MIYAZAKI,
AKIHIKO MOCHIZUKI, and RINTARO NAKAYA

Department of Microbiology, Tokyo Medical and Dental University School of Medicine

Susceptibility to fosfomycin (FOM) of 159 clinical isolates of *Campylobacter jejuni* was tested by a new method using Nutrient agar (Difco) supplemented with 5% horse-defibrinated blood and 0.2% MgCl₂ as test plates. The minimal inhibitory concentrations (MIC) of FOM against 50 and 90% of the strains were 3.13 and 25 µg/ml, respectively. These values were almost equivalent as those of ampicillin, kanamycin, and nalidixic acid and slightly higher than those of erythromycin and mid-ecamycin. MICs of erythromycin against the *C. jejuni* strains were also tested by the new method as well as by the standard method and it was revealed that there was no difference between the values obtained by the two methods.